

H. Baumann und P. S. Chen. — Geschlechtsspezifische ninhydrinpositive Substanzen in Adultmännchen von *Drosophila funebris*.¹ (Mit 2 Textabbildungen und einer Tabelle.)

Zoologisch-vergl. anatomisches Institut der Universität Zürich.

Im Rahmen unserer Untersuchungen über die physiologisch-biochemischen Grundlagen der Fortpflanzung bei *Drosophila* gewinnen die Anhängsdrüsen (Paragonien) der adulten Männchen ein besonderes Interesse, deren Sekrete spezifische Wirkungen auf den Metabolismus der begatteten Weibchen aufweisen (für zusammenfassende Literatur, siehe CHEN, 1971). Bei *Drosophila melanogaster* wurde eine Paragoniensubstanz (Sexpeptid) nachgewiesen, die während der Kopulation von Männchen in die Genitalien der Weibchen übergeführt wird und die Eiablage stimuliert. Eine weitere Untersuchung von insgesamt acht verschiedenen *Drosophila*-Arten ergab, dass diese Substanz nur bei *Drosophila simulans*, *ananasae* und *buskii* vorkommt, während sie bei den übrigen untersuchten Arten vollständig fehlt (CHEN und BAUMANN, 1972). Es scheint, dass die Zusammensetzung der Paragonienssekrete artspezifisch ist. Bei denjenigen Arten, wo die Paragoniensubstanz fehlt, könnten andere Komponenten im Sekret die stoffwechsel-physiologischen Vorgänge der Weibchen auf ähnliche Weise beeinflussen. Tatsächlich fanden wir bei Adultmännchen von *Drosophila funebris* zwei ninhydrinpositive Substanzen, die sich aufgrund ihres chromatographischen Verhaltens und ihrer chemischen Zusammensetzung klar von derjenigen von *Drosophila melanogaster* unterscheiden. Wir beschränken uns hier auf eine vorläufige Mitteilung über die Identifizierung und die möglichen Funktionen dieser Substanzen; ein ausführlicher Bericht der vorliegenden Untersuchung soll später veröffentlicht werden.

MATERIAL UND METHODEN

Larven des Wildtyps von *Drosophila funebris* wurden auf Standardmedium (Mais-Zucker-Hefe-Agar) bei 18° C aufgezogen. Nach dem Schlüpfen aus den Puppen wurden die Fliegen bei 25° C gehalten.

Lipidfreie methanolische Extrakte von Paragonien oder Abdomen adulter

¹ Ausgeführt und herausgegeben mit Unterstützungen durch den Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung und die Georges und Antoine Claraz-Schenkung.

Fliegen im Alter von 10 Tagen wurden nach den früher beschriebenen Methoden hergestellt (CHEN und BÜHLER, 1970). Die Auftrennung der in den Extrakten enthaltenen Ninhydrin-positiven Stoffe geschah durch Hochspannungselektrophorese nach BAUMANN (1971) oder Säulenchromatographie. Nach der Auftrennung wurden die geschlechtsspezifischen Substanzen einzeln mit 6 N HCl bei 110° C während 24 Stunden hydrolysiert.

Um die funktionelle Bedeutung der erwähnten Substanzen zu prüfen, injizierten wir Paragonienextrakte oder partiell gereinigte Paragoniensubstanzen in die Bauchhöhle 1-tägiger, unbegatteter Weibchen. Nach der Injektion wurden die Fliegen einzeln in Plexiglastuben bei 25° C gehalten. Das Futter wurde täglich erneuert, und die Anzahl der abgelegten Eier während 14 Tagen kontrolliert. Als Kontrollen dienten entweder die mit Ringerlösung injizierten Weibchen oder solche, die mit Männchen zusammen gehalten worden waren.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Abbildung 1 zeigt die Auftrennung der Ninhydrin-positiven Komponenten von Abdomen in methanolischen Extrakten 10-tägiger Männchen und Weibchen. Im Vergleich mit den Weibchen zeichnet sich das chromatographische Muster der männlichen Fliegen durch zwei zusätzliche Flecken aus: der eine Fleck (PS-1) liegt wenig kathodenwärts vom Auftragspunkt auf der Höhe von Tyrosin und Tryptophan und weist eine sehr geringe Wanderungsfähigkeit im 70%igen n-Propanol auf, während der zweite (PS-2) sich relativ schnell zur Kathode bewegt und links neben Serin lokalisiert ist. Zudem bildet PS-1 mit Ninhydrin eine charakteristische blaue Farbe, während PS-2 sich gelbbraun färbt. Aus Abbildung 1 ist ferner ersichtlich, dass die für *Drosophila melanogaster* typische Paragonien-substanz, die sich unter der gleichen chromatographischen Bedingung links neben der Dreiergruppe Glycerophosphoäthanolamin (GPEA)-Phosphoäthanolamin (PEA)-Phosphoserin (PSER) befindet, ganz fehlt. Unsere Untersuchungen an Paragonienextrakten bewiesen, dass die beiden ninhydrinpositiven Substanzen ausschliesslich in diesen Drüsen lokalisiert sind.

Die Analysen der methanolischen Extrakte aus 0,4-0,6 g 10-tägiger Männchen oder virgineller Weibchen mittels des Aminosäure-Analysators bestätigen die oben erwähnten Befunde. PS-1 wird als ein ziemlich breiter Peak in der sauren Region zwischen Glycerophosphoäthanolamin und Taurin aus der Säule eluiert, während PS-2 als ein deutlich abgegrenzter Peak kurz vor γ -Aminobuttersäure erscheint. Die entsprechenden Peaks wurden bei virginellen Weibchen nicht gefunden.

Elektrophoretische und papierchromatographische Untersuchungen der sauren Hydrolysate beider Substanzen ergaben, dass PS-1 aus 10 Aminosäuren

(ASP, GLU, THR, SER, PRO, VAL, LEU, α -ALA, ARG, LYS) besteht, während PS-2 nur GLY enthält. Dies deutet darauf hin, dass PS-1 ein Polypeptid sein muss, und PS-2 ein Glycinderivat ist. Unsere Versuche über die chemische Struktur dieser Substanzen sind noch im Gang.

Der Verlauf der Eiablage bei den mit Paragonienextrakten injizierten Weib-

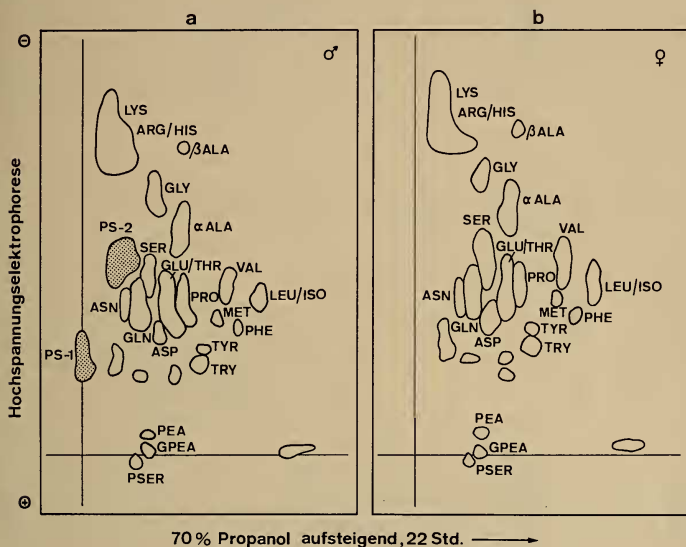


ABB. 1.

Auftrennung der Ninhydrin-positiven Substanzen in methanolischen Extrakten von 30 Abdomen adulter Männchen (a) und 20 Abdomen adulter Weibchen (b) im Alter von 10 Tagen. 1. Dimension: Hochspannungselektrophorese (2050-2500 V, 95-120 mA, 2 1/4 Std); 2. Dimension: Papierchromatographie (70 % n-Propanol, aufsteigend, 22 Std).

chen sowie derjenige der begatteten und mit Ringerlösung injizierten virginellen Kontrollen sind in Abbildung 2 wiedergegeben. Eindeutig ist der rasche Anstieg der täglich abgelegten Eier bei begatteten Weibchen während den ersten 6 Tagen des Adultlebens. Virginelle Weibchen, die mit Ringerlösung injiziert worden waren, wiesen eine Verzögerung der Eiablage in den ersten 6 Tagen nach der Injektion auf, und legten nie mehr als 100 Eier pro Tag ab. Tiere, die eine einmalige Injektion der partiell gereinigten Paragoniensubstanz PS-2 erhielten, zeigten einen deutlichen und stärkeren Anstieg in ihrer Anzahl der abgelegten Eier pro Weibchen pro Tag als die mit Ringerlösung injizierten Kontrollen. Eine ähnlich stimu-

lierende Wirkung konnte nach der Injektion der rohen methanolischen Extrakte festgestellt werden. Dies ist verständlich, da diese Extrakte ebenfalls PS-2 enthielten. Hingegen erbrachte die Injektion von PS-1 keine Stimulation der Eiablage, und der Verlauf der Eiablage bei diesen Weibchen unterscheidet sich nicht von demjenigen der Ringerkontrolle (siehe Abb. 2).

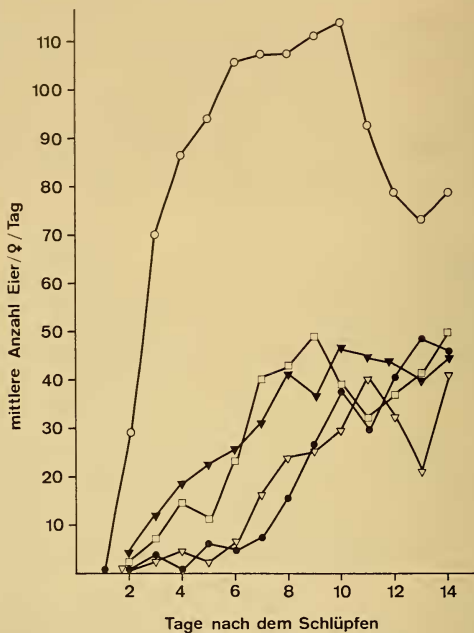


ABB. 2.

Verlauf der Eiablage von befruchteten Weibchen (○) sowie virginellen Weibchen nach der Injektion mit Ringerlösung (●), PS-1 (△), PS-2 (□) und rohem Methanolextrakt (▲). Ordinate: mittlere Anzahl Eier pro Weibchen pro Tag. Abszisse: Tag nach der Begattung oder Injektion.

In einer weiteren Serie der Injektionsversuche wurde die Wirkung der Paragonsubstanzen auf die Rezeptivität der Weibchen untersucht. Die Adultweibchen wurden kurz nach dem Schlüpfen isoliert und 48 Stunden in Flaschen mit frischem Futter bei 25° C gehalten. Danach wurden die Fliegen mit Ringerlösung, PS-1 oder PS-2 injiziert und einzeln in Tuben gegeben. Nach einer Erholungszeit von 24 Stunden wurden zu jedem Weibchen drei gleichaltrige Männchen gegeben und die Kopulation während den folgenden 45 Minuten registriert. Als zusätzliche

Kontrolle wurden Adultweibchen ohne Injektion angesetzt und ihre Rezeptivität unter der gleichen Versuchsanordnung beobachtet.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Bei nicht injizierten Weibchen erfolgte die erste Kopulation, die ca. 10-20 Minuten dauerte, bereits innerhalb 1-5 Minuten. Die Rate der ersten Kopulation betrug 97%. Wurden die so einmal begatteten Weibchen nach 24 Stunden wieder mit Männchen zusammengebracht, so fiel die Kopulationsrate auf 18% ab. Nach der Injektion mit PS-1 betrug die Kopulationsrate 72%. Andererseits wurde die Bereitschaft zur Kopulation offenbar durch die Injektion mit PS-2 nicht vermindert (98%). Die Injektion mit Ringerlösung ergab ebenfalls keinen Einfluss auf die Rezeptivität.

TABELLE 1

Rezeptivität von Drosophila funebris Weibchen nach einmaliger Begattung oder Injektion mit PS-1, PS-2 oder Ringerlösung

Zustand der Weibchen	Anzahl der untersuchten Weibchen	Anzahl Begattungen nach 24 Std.	Rezeptivität
Einmal begattet	32	6	18 %
Injektion mit PS-1	36	26	72 %
„ „ PS-2	56	55	98 %
„ „ Ringer	58	58	100 %

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung darauf hin, dass die von uns festgestellten Paragoniensubstanzen bei *Drosophila funebris* unterschiedliche funktionelle Bedeutungen haben: PS-1 setzt die Rezeptivität der Weibchen herab, während PS-2 die Eiablage stimuliert. Allerdings ist die Wirkung der beiden Substanzen nach Injektion in die Bauchhöhle der Weibchen geringer als diejenige nach einer Kopulation. Dies steht in Übereinstimmung mit der früher bei *Drosophila melanogaster* gemachten Beobachtung, wonach die Transplantation der Paragoniendrüsen (GARCIA-BELLIDO, 1964; LEAHY, 1966) oder die Injektion der gereinigten Substanz (CHEN und BÜHLER, 1970) nie die gleiche Eilegerate eines normal begatteten Weibchens erreicht. Die einfachste Erklärung liegt darin, dass die Paragoniensubstanzen normalerweise in den Genitalapparat der Weibchen gelangen, wo sie direkt oder indirekt auf die nervösen Zentren oder das endokrine System wirken können. Im Fall der Injektion in die Bauchhöhle werden sie teils durch die Hämolymphe verdünnt, teils durch die Enzymaktivität abgebaut. Sie gelangen deshalb nur teilweise an die Wirkungs-orte. Andere Erklärungsmöglichkeiten sind selbstverständlich nicht ausgeschlossen, solange der Wirkungsmechanismus von Paragoniensubstanzen noch unbekannt ist.

Unsere bisherigen Untersuchungen an *Drosophila melanogaster* und *Drosophila funebris* zeigen, dass verschiedene Paragoniensubstanzen die Stimulation der Eiablage bewirken können. Die Tatsache, dass das Paragoniensekret die Kopulationsbereitschaft der Weibchen herabsetzt, ist offenbar ein verbreitetes Phänomen bei Insekten. Bei *Musca domestica* handelt es sich um ein Peptid (NELSON et al, 1969), und bei *Aedes aegypti* um ein Protein (FUCHS et al, 1969; FUCHS und HISS, 1970). Die Isolierung der einzelnen Paragonienstoffe und die Analyse ihrer chemischen Natur bilden den ersten Schritt bei der Aufklärung physiologisch-biochemischer Grundlagen in der Fortpflanzung bei Insekten.

SUMMARY

By both high-voltage paper electrophoresis and ion-exchange chromatography, two sex-specific ninhydrin-positive substances have been found in the accessory glands of the adult males of *Drosophila funebris*. On the basis of acid hydrolysis, one of these (PS-1) is a polypeptide consisting of 10 amino acids, whereas the second one (PS-2) is probably a glycine derivative. Experiments of injecting the partially purified paragonial substances into virgin females suggest that PS-1 reduces receptivity while PS-2 stimulates oviposition of the female flies.

LITERATUR

- BAUMANN, H. 1971. Untersuchungen über die *in vivo* Synthese des Sexpeptids bei *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Universität Zürich.
- CHEN, P. S. 1971. Biochemical Aspects of Insect Development. Karger, Basel.
- CHEN, P. S. und H. BAUMANN. 1972. Untersuchungen über das Vorkommen des Sexpeptids bei verschiedenen *Drosophila*-Arten. *Rev. suisse Zool.* 79: 333-341.
- CHEN, P. S. and R. BÜHLER. 1970. Paragonial substance (sex peptide) and other free ninhydrin-positive components in male and female adults of *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* 16: 615-627.
- FUCHS, M. S. and E. A. HISS. 1970. The partial purification and separation of the protein components of matrone from *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.* 16: 931-939.
- FUCHS, M. S., G. B. CRAIG, Jr. and D. D. DESPOMMIER. 1969. The protein nature of the substance inducing female monogamy in *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.* 15: 701-709.
- GARCIA-BELLIDO, A. 1964. Das Sekret der Paragonien als Stimulus der Fekundität bei Weibchen von *Drosophila melanogaster*. *Z. Naturforsch.* 19b: 491-495.
- LEAHY, M. G. 1966. Egg deposition in *Drosophila melanogaster* increased by transplant of male paragonia. *Dros. Inf. Ser.* 41: 145-146.
- NELSON, D. R., T. S. ADAMS and J. G. POMONIS. 1969. Initial studies on the extraction of the active substance inducing monocoitic behavior in houseflies, black blowflies and screw-worm flies. *J. econ. Ent.* 62: 634-639.